CURSO APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

Dra. Viviana Novoa.

Laboratorio de Inmunología.

Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad. Hospital General de Agudos Dr. Carlos G. Durand.

C.A.B.A. Argentina

DEFINICIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno clonal severo, no maligno y adquirido de la célula madre hematopoyética, caracterizado principalmente por hemólisis intravascular, trombosis y falla medular.

Es una entidad poco frecuente con gran variabilidad clínica. Su incidencia es de aproximadamente 1.3/millón habitantes/ año. Clon HPN > 10%: 0.56/millón habitantes/año.

Afecta a los dos sexos a cualquier edad, aunque es más frecuente en adultos jóvenes del sexo femenino.

1882- Primera descripción de la enfermedad por Strübing

1911- Redescubierta por Marchiafava y Micheli→
Enfermedad de Marchiafava y Micheli.
Evidencia de la sensibilidad de los GR a la hemólisis.

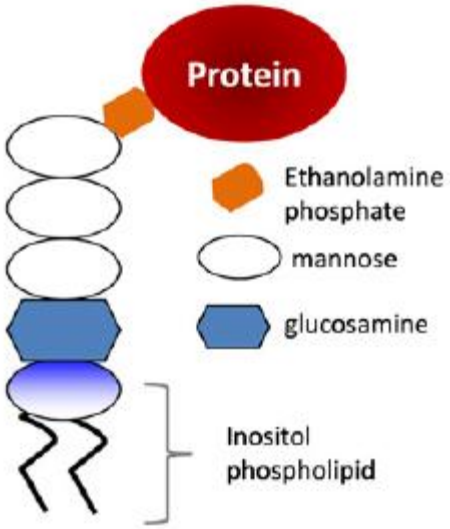
1928- Se renombró como Hemoglobinuria Paroxística Nocturna debido a la orina oscura que presentaban los pacientes en la mañana.

1930- Se conoce que la lisis de GR es dependiente del Complemento y del ph.

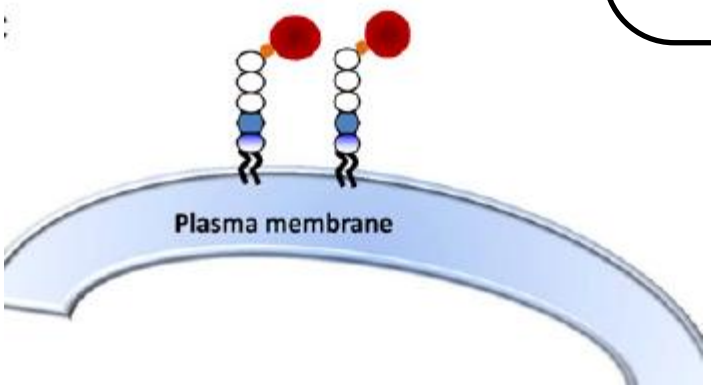
1938- Primeras pruebas diagnósticas de laboratorio: Test de Ham.

ETIOPATOGENIA

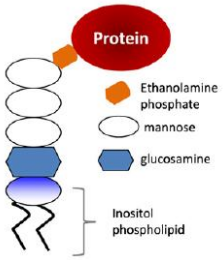
Mutación somática en el gen fosfatidil inositol glucano clase A (PIG-A) que se encuentra en el brazo corto del cromosoma X.



Este gen codifica una proteína involucrada en la síntesis del grupo de anclaje a membrana glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual sirve de unión a membrana a muchas proteínas.



En la HPN se observa disminución o ausencia de las proteínas que se anclan a la membrana de las células a través del GPI.



DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS ANCLADAS A GPI EN CÉLULAS HEMATOPOYETICAS

Cél. Progenitora
CD48 CD55 CD58
CD59 CD90 CD109

Eritrocitos
CD55
CD58
CD59
CD108

Plaquetas
CD55 CD58
CD59 CD109

Cél. NK
CD48 CD52
CD55 CD58
CD59 CD87
CD108 CD16

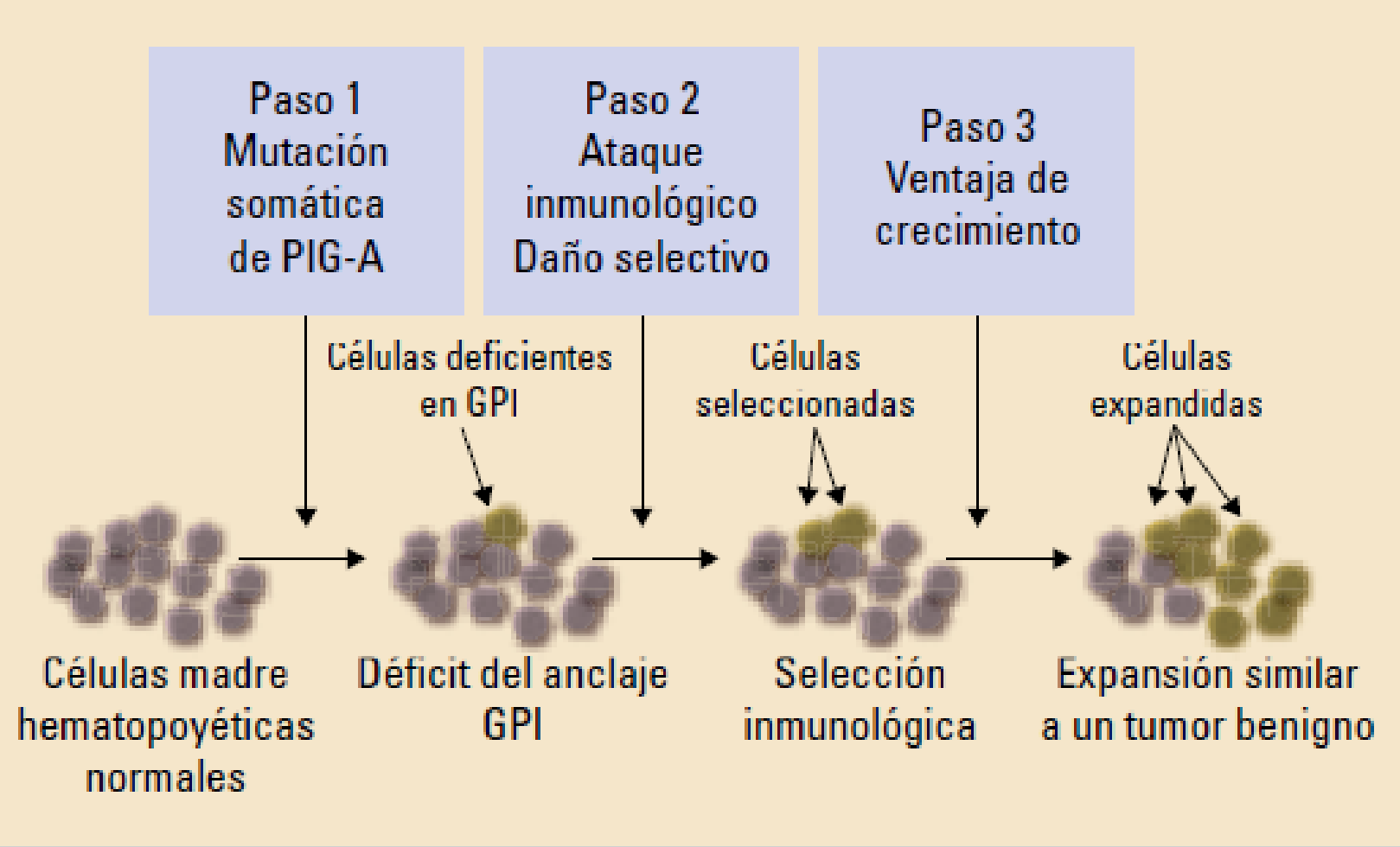
Neutrófilo
CD16 **CD24**
CD52 CD55
CD58 **CD66b**,c,e
CD87 CD109
CD157

Linfocito T
CD48 CD52
CD55 CD58
CD59 CD73
CD87 CD90
CD108 CD109

Monocitos
CD14 CD48
CD52 CD55
CD58 CD59
CD87 CD109
CD157

Linfocito B
CD24 CD48
CD52 CD55
CD59 CD73
CD108

EXPANSIÓN DEL CLON HPN



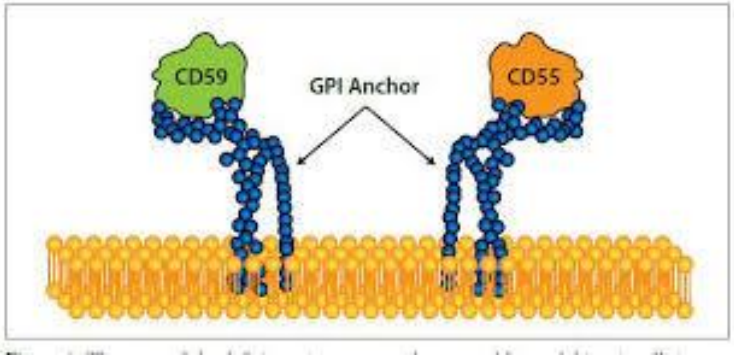
Inoue et al / International Journal of Hematology 77 (2003) 107-112

Medicine. 2016;12(20):1159-69

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

HEMÓLISIS INTRAVASCULAR	**HEMOGLOBINURA** **ANEMIA** **DISTONÍA DEL MÚSCULO LISO** **(dolor abdominal, disfagia, disfunción eréctil, fatiga, etc)**
TROMBOSIS	**TROMBOSIS EN SITIOS INUSUALES.** **VENOSAS: Síndrome de Budd-Chiari, venas abdominales, cerebrales, dérmicas y de la retina)** **ARTERIALES: cerebrales y coronarias.** **MORBIMORTALIDAD MATERNO- FETAL**
FALLA MEDULAR	**CITOPENIAS**
OTRAS	**INSUFICIENCIA RENAL** **HIPERTENSIÓN PULMONAR** **INFECCIONES**

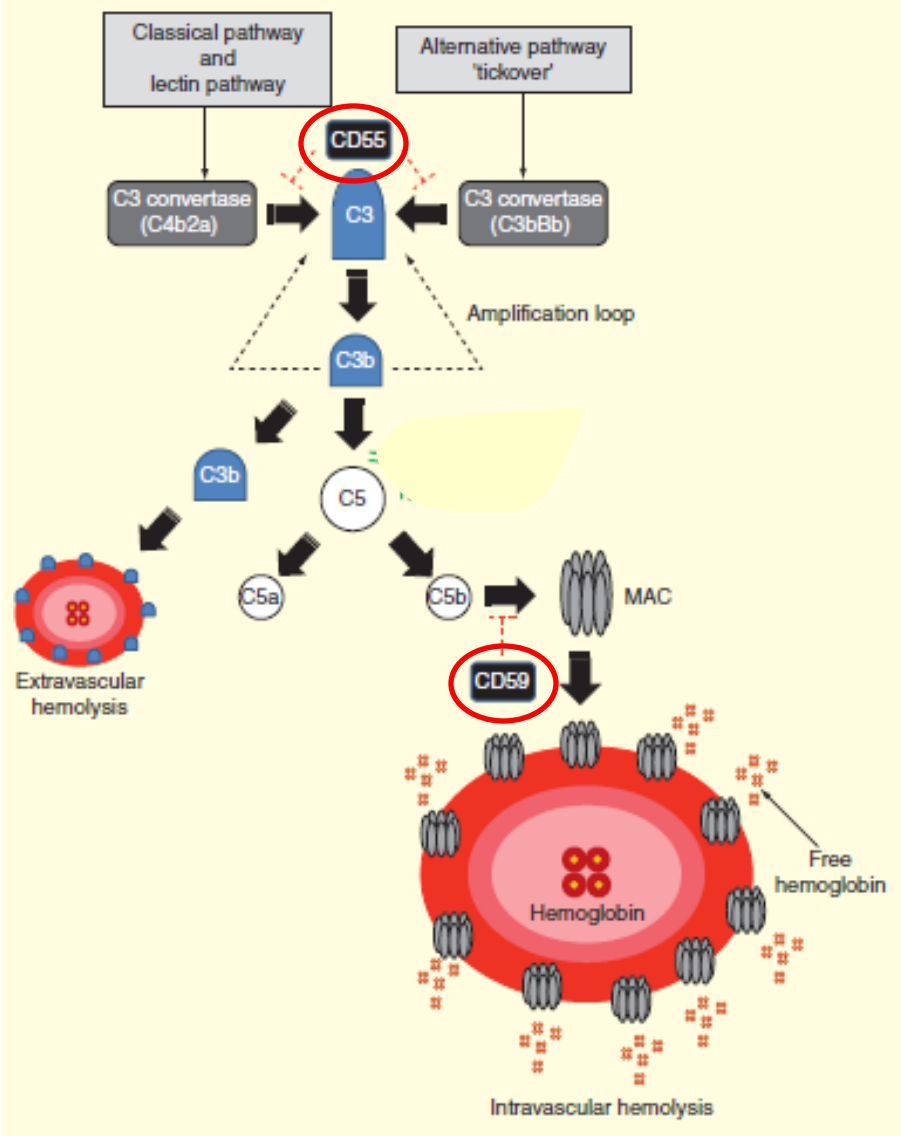
FISIOPATOLOGÍA



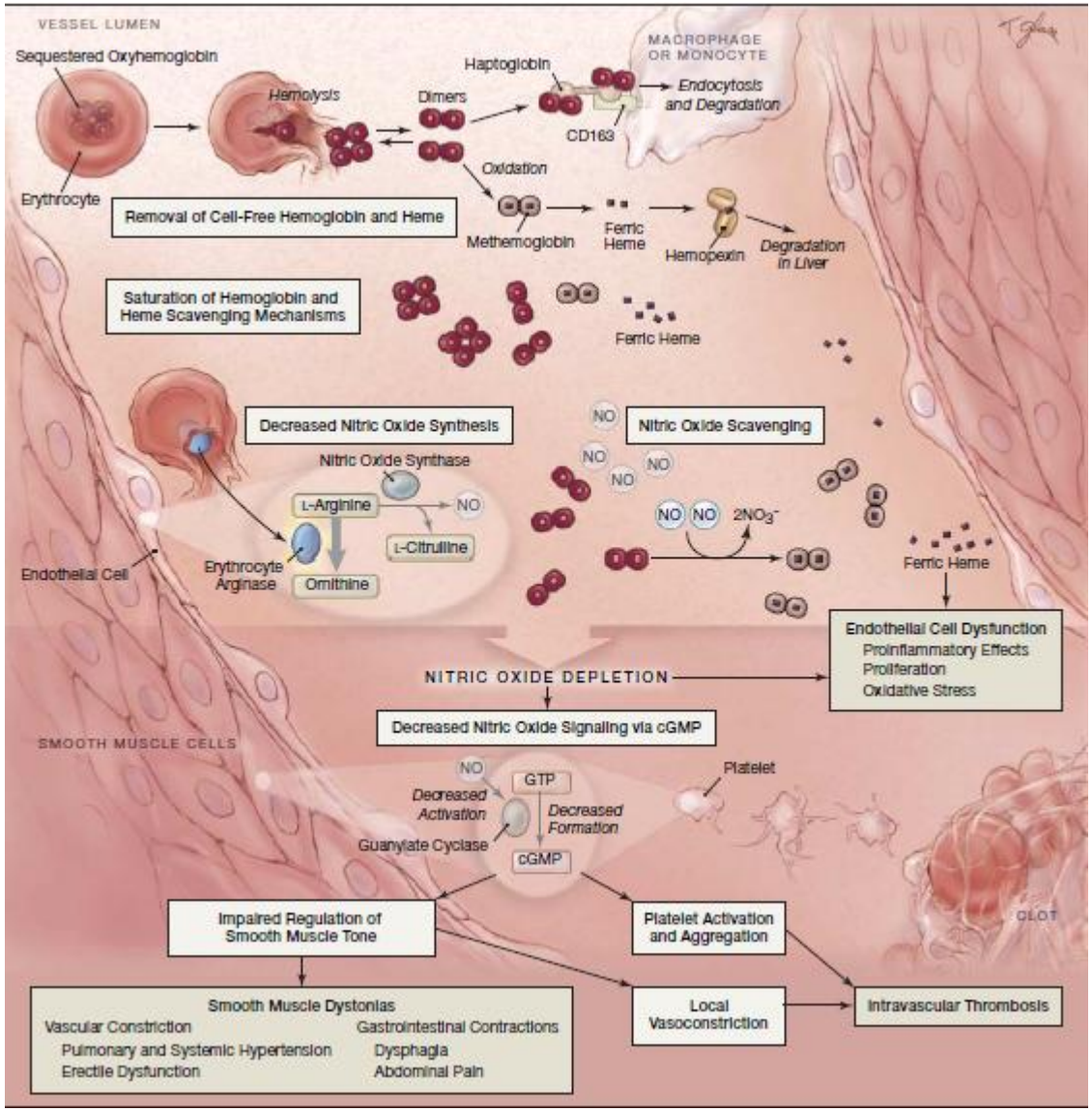
El CD55 y CD59 protegen a las células de la activación de complemento.

Por falta de CD55 y CD59 el GR es lisado por acción del complemento

Hemólisis intravascular



RELACIÓN ENTRE HEMÓLISIS INTRAVASCULAR Y TROMBOSIS



JAMA. 2005;293:1653-1662

La hemólisis intravascular produce liberación de Hb y Fe al plasma que son clarificados por la haptoglobina, y la hemopexina.

Exceso de hemólisis satura los sistemas de remoción. La Hb libre y Fe tienen efectos sobre células endoteliales.

El NO en sangre reacciona con la oxihemoglobina. La ↓ de NO produce alteración del tono muscular (distonía), activación y agregación plaquetaria y efectos en la cascada de coagulación.

Otras proteínas unidas a GPI como UPAR, PR3-CD177,etc intervienen en la cascada de coagulación

Favorece la trombosis

CLASIFICACIÓN

HPN CLÁSICA

- Pacientes con hemólisis intravascular y/o trombosis. Otros síntomas clínicos también están presentes, como la anemia, fatiga, disfunción eréctil, disfagia, dolor abdominal, falla renal, etc. No hay evidencia de falla medular. Estos pacientes en general presentan clones HPN de gran tamaño (≥ 50%).

HPN EN EL CONTEXTO DE OTRA PATOLOGÍA HEMATOLÓGICA

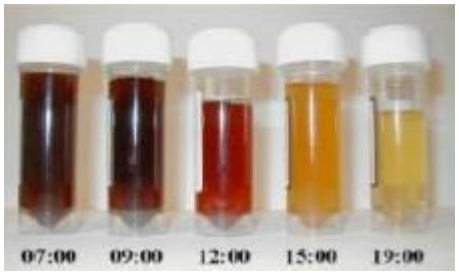
- Pacientes con evidencia clínica y/o de laboratorio de hemólisis intravascular y que presentan otra patología hematológica primaria como AA o SMD. La mayoría de los pacientes presentan clones HPN pequeños (<30%). La falla medular es la que domina el cuadro clínico.

HPN SUBCLÍNICA

- Pacientes que presentan clones HPN pequeños (en general <1%) por citometría de flujo y no tienen síntomas clínicos ni evidencia de hemólisis. Se asocia típicamente a aplasia medular.

IMPORTANTE EL TAMAÑO DEL CLON HPN

LABORATORIO



- Hematuria, hemoglobinuria, hemosideruria.
- Aumento de LDH.
- Disminución de Haptoglobina.
- Aumento de reticulocitos.
- Déficit de Fe.
- Citopenias.
- Bilirrubina indirecta aumentada.
- Alteración de la función renal y hepática
- Activación de la coagulación → Dímero D.

TEST DE DIAGNÓSTICO

- **1939 →TEST DE HAM:** GR incubados con suero acidificado y medición de la Hb liberada por espectofotometría.

- **1966 →TEST DE HEMOLISIS DE LA SUCROSA:** Hemólisis de los GR luego de la incubación de sangre con solución hipotónica de sucrosa.

- **1985 → CITOMETRÍA DE FLUJO:** CD55 y CD59 en GR principalmente, GB y plaquetas.

- **2000 → CITOMETRÍA MULTIPARAMÉTRICA:** Utilización de AcMo contra otras proteínas unidas a GPI y AcMo para identificar linaje. Estudio en GR y leucocitos.

- **2010- 2012 → CITOMETRÍA DE FLUJO DE ALTA SENSIBILIDAD:** Mayor adquisición de eventos. Detección de pequeños clones.

CITOMETRÍA DE FLUJO

ES LA TÉCNICA DIAGNÓSTICA DE ELECCIÓN

MONITOREO DEL TAMAÑO DEL CLON HPN

DETECTA Y CUANTIFICA LAS CÉLULAS CON DEFICIENCIA EN GPI (CLON HPN)

PERMITE LA CLASIFICACIÓN DEL CLON HPN

VENTAJAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

- Técnica rápida.
- Alta sensibilidad y especificidad.
- Análisis cuantitativo y cualitativo del clon HPN.
- Análisis de diferentes líneas celulares.
- Buena reproducibilidad.
- Estandarización

ESTANDARIZACIÓN: GUIAS DIAGNÓSTICAS

- Borowitz and col. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxismal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Cytometry Part B. **2010**; 78B: 211- 230.

- Sutherland and col. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. Cytometry Part B. **2012**; 82B: 195-208.

- Guia clínica HPN. Consenso español para diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. **2014**.

- Sutherland and col. High-Sensitivity detection of PNH red blood cells, red cell precursors and white blood cells. Current Protocols in Cytometry. **2015**.

- ICCS/ESCCA Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders. Cytometry Part B, 94B. **2018**.

SE RECOMIENDA EL ESTUDIO DE CLONES HPN POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN:

- Hemoglobinuria.
- Hemólisis intravascular Coombs directa negativa de causa inexplicada, aumento de LDH en suero y especialmente en pacientes con deficiencia de Fe.
- Trombosis no explicadas venosa o arteriales en pacientes jóvenes o con trombosis en sitios inusuales: síndrome de Budd-Chiari, venas portal o mesentéricas, venas cerebrales o dérmicas.
- Disfagia intermitente o dolor abdominal de etiología no explicada con evidencia de hemólisis intravascular.
- Citopenias idiopáticas o mantenidas de significado incierto.
- Pacientes con diagnóstico de AA, al diagnóstico y anualmente.
- Pacientes con diagnóstico de SMD hipoplásico, especialmente en pacientes jóvenes.

ESTUDIO DE CLONES HPN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

MUESTRA DE ELECCIÓN: Sangre periférica en EDTA (heparina)

ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA EVALUAR DEFICIENCIA DE GPI

ANTICUERPO	CLON	CÉLULAS
CD59	MEM-43	ERITROCITOS
CD16	3G8	NEUTRÓFILOS
CD24	ALB9	NEUTRÓFILOS
CD66b	G10F5	NEUTRÓFILOS
CD14	MOP9	MONOCITOS
FLAER		NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS
CD157	SY11B5	NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS

ANTICUERPOS PARA IDENTIFICAR LAS POBLACIONES A EVALUAR

POBLACIÓN	ANTICUERPO
ERITROCITOS	CD235a, CD45
NEUTRÓFILOS	CD15, CD10, CD33, CD45
MONOCITOS	CD64, CD33, CD45
LINFOCITOS	NO SE EVALÚAN

ALGUNOS PANELES RECOMENDADOS

ERITROCITOS

CD235a FITC/ CD59 PE/ CD45 PerCP
CD235a FITC/ CD59 PE/ CD61 PerCPCy5/ CD45 PECy7

LEUCOCITOS

PANELES DE 5 COLORES

FLAER/ CD157 PE/ CD15 PerCPCy5.5/ CD64 V450/ CD45 V500

PANELES DE 6 COLORES

FLAER/ CD157 PE/ CD10 APC/ CD14 APCH7/ CD64 V450/ CD45 V500

FLAER/ CD157 PE/ CD64 PerCPCy5/ CD45 PECy7/ CD35 APC/ CD10 APC-C750

FLAER/ CD24 PE/ CD15 PerCPCy5.5/ CD14 APC/ CD64 V450/ CD45V500

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

LEUCOCITOS

SP + Acs Mo

↓

Incubar

↓

Lisis de GR

↓

Lavar con PBS/Alb

↓

Re-suspender y Adquirir

Alta sensibilidad: 500.000 eventos por población

ERITROCITOS

SP diluida (1:100) + Acs Mo

↓

Incubar

↓

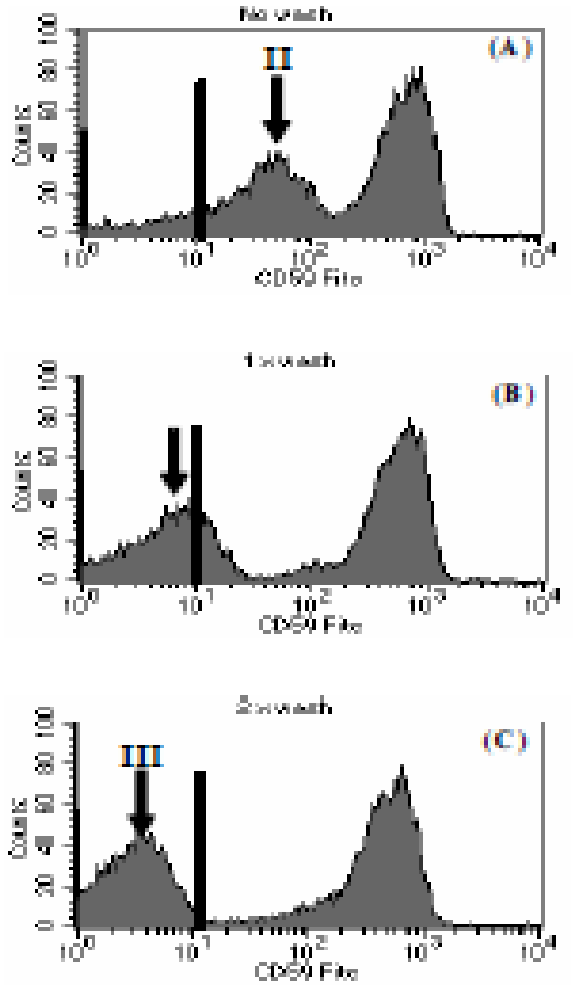
Lavar con PBS (sin Alb) 2 veces.

↓

Re-suspender y Adquirir

Alta sensibilidad: 500.000 de GR

EFECTO DEL LAVADO SOBRE ERITROCITOS



Sin lavados

1 solo lavado

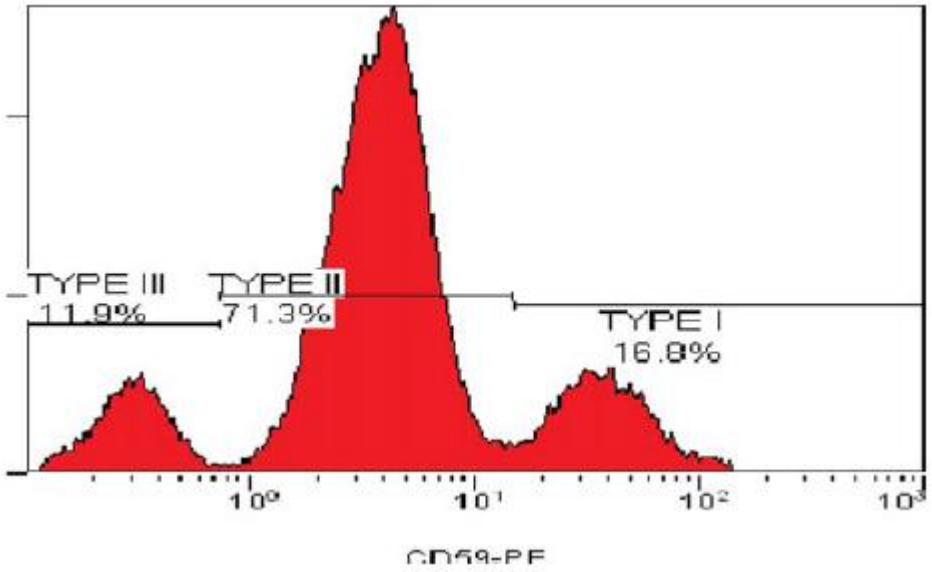
2 lavados

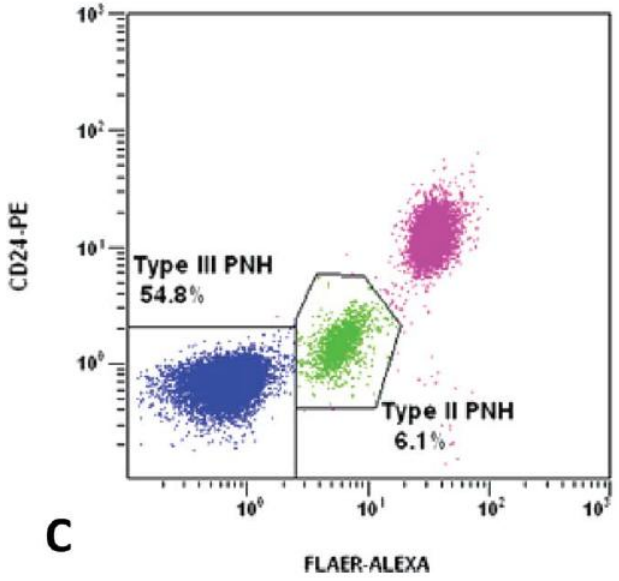
Figure 2. Effect of washing on CD59 (Invitrogen, clone MEM-43) staining of PNH red cells. In the absence of washing, excess CD59 antibody binds nonspecifically to CD59-deficient cells and demonstrates an apparent Type II population. Appropriate washing (C) shows that these are in fact Type III cells.

Guías de Consenso. Borowitz y col. 2009.

TIPOS DE CLONES HPN SEGÚN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS ANCLADAS A GPI

- CLON HPN TIPO I: Expresión normal
- CLON HPN TIPO II: Expresión parcial
- CLON HPN TIPO III: Ausencia de expresión

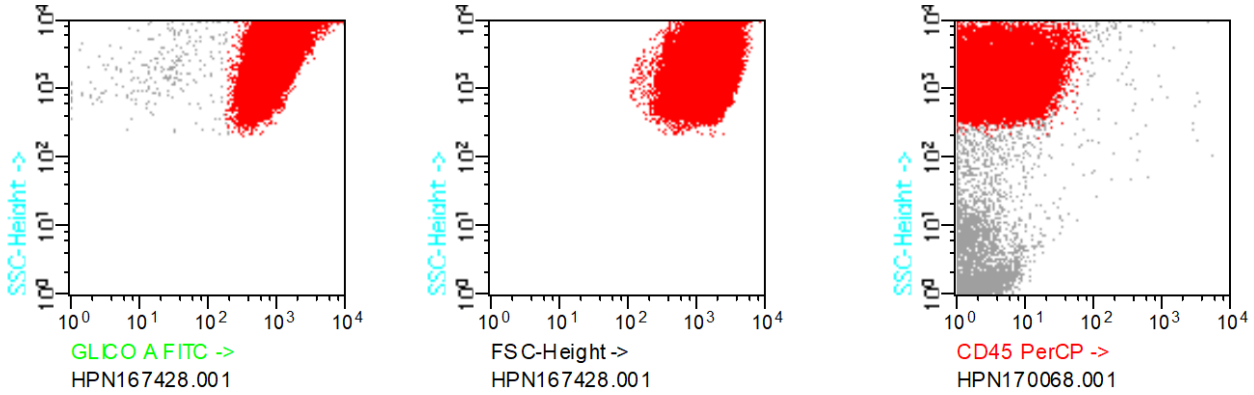




Borowitz et al. Cytometry Part B, 78 B: 211-230 (2010)

ANÁLISIS DE ERITROCITOS

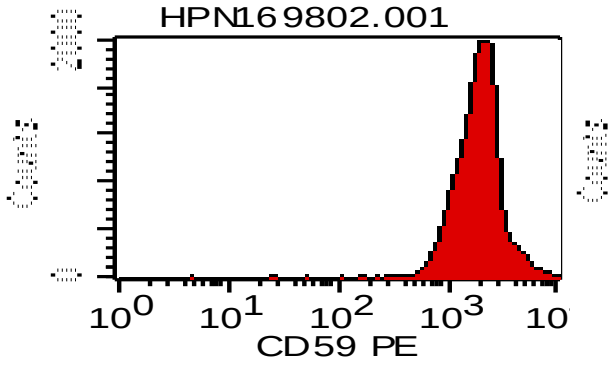
CD235a FITC/ CD59 PE/ CD45 PerCP

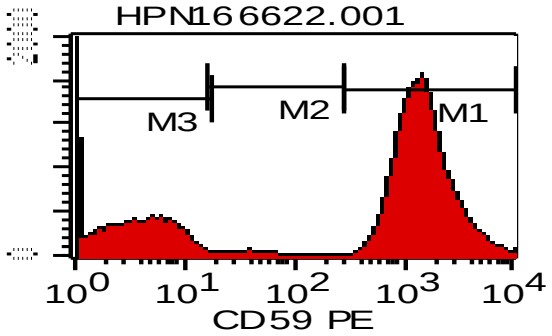


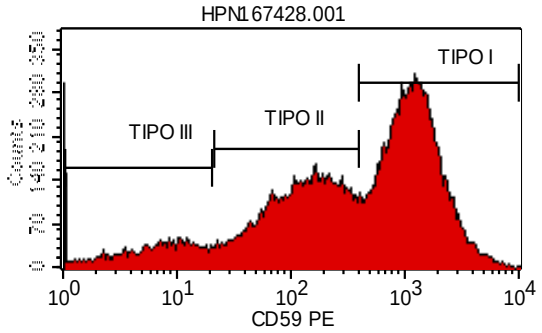
NORMAL

HPN (+)

HPN (+)





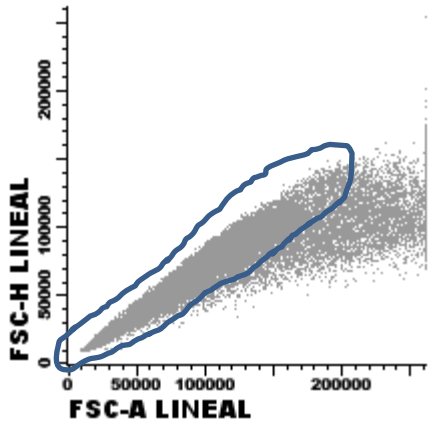


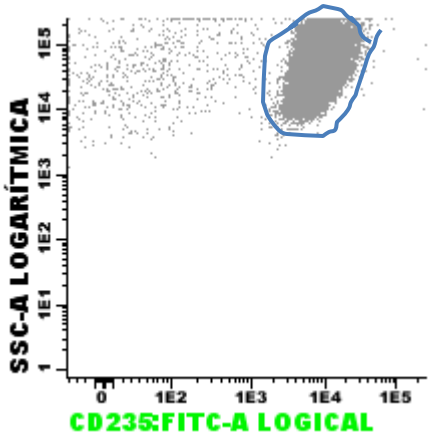
Clon Tipo II: 1.7%
Clon Tipo III: 25.9%
Clon HPN total: 27.6%

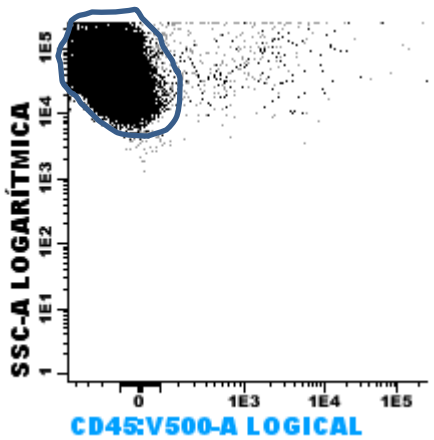
Clon Tipo II: 39%
Clon Tipo III: 10%
Clon HPN total: 49%

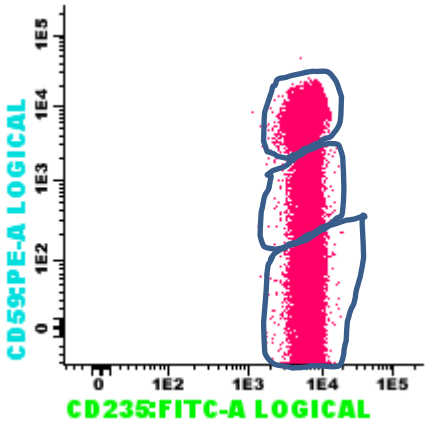
EL ANÁLISIS DE ERITROCITOS PERMITE DETERMINAR EL TIPO DE CLON HPN

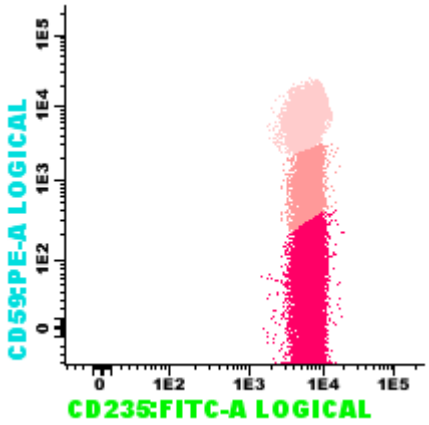
ANÁLISIS DE ERITROCITOS

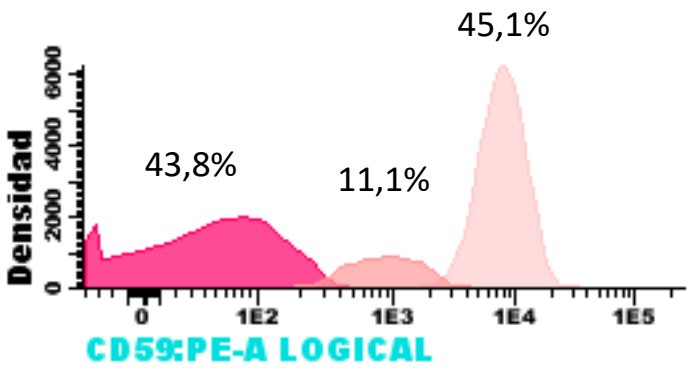












Clon Tipo II + Clon tipo III = Clon HPN total → 54.9%

DOI: 10.1002/cyto.b.21853

ORIGINAL ARTICLE

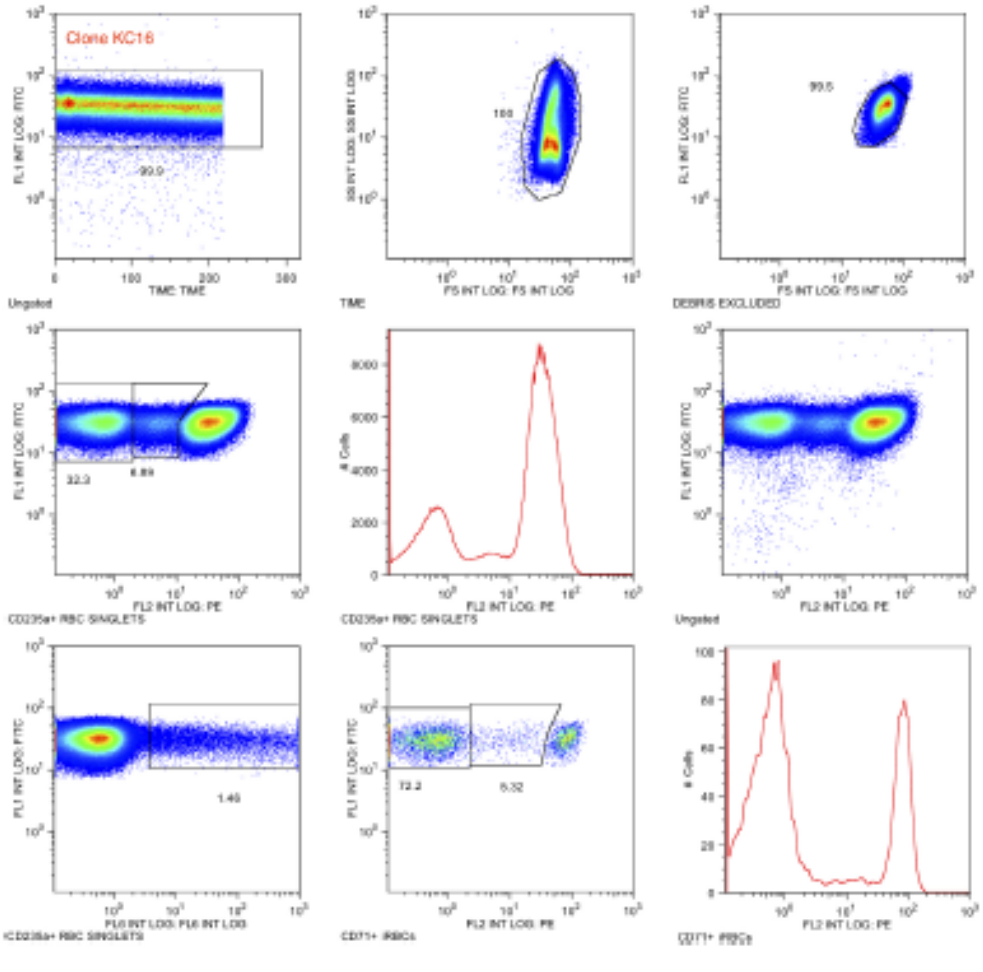
CLINICAL CYTOMETRY WILEY

CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature RBCS in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

D. Robert Sutherland[1] | Stephen J. Richards[2] | Fernando Ortiz[3] | Rakesh Nayyar[4] | Miroslav Benko[5] | Iuri Marinov[6] | Andrea Illingworth[7]

GR inmaduros CD71(+)

- ❖ No son afectados por la hemólisis ni por las trasfusiones.
- ❖ El tamaño total del clon HPN es muy similar al de neutrófilos y monocitos.
- ❖ Representación más precisa de las proporciones tipo II y tipo III.
- ❖ Confirma la presencia o ausencia del clon tipo II en caso de transfusiones previas.
- ❖ En AA y fallo medular no es útil.

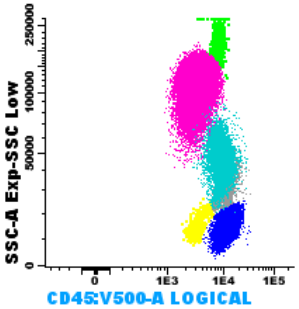


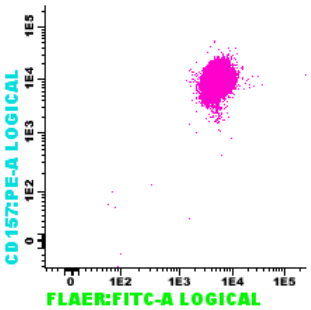
ANÁLISIS DE LEUCOCITOS

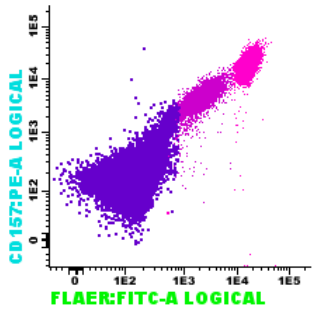
FLAER/ CD157 PE/ CD10 APC/ CD14 APCH7/ CD64 V450/ CD45V500

Normal

HPN(+)

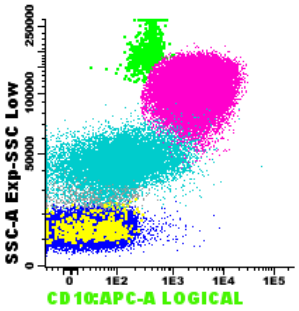


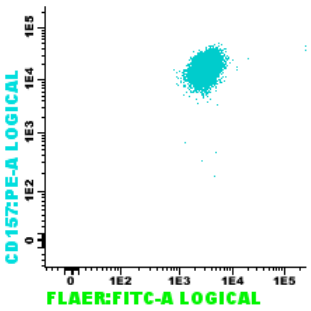


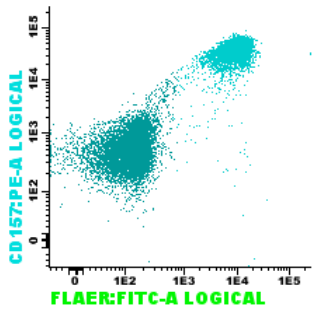


NEUTRÓFILOS

Clon HPN: 73.6%

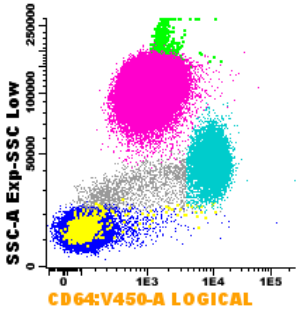


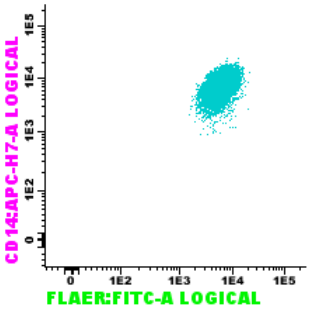


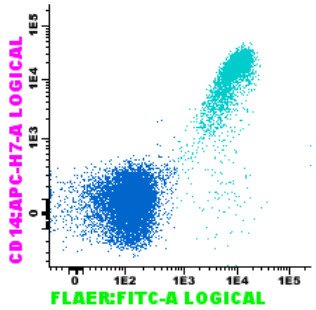


MONOCITOS

Clon HPN: 64.2%

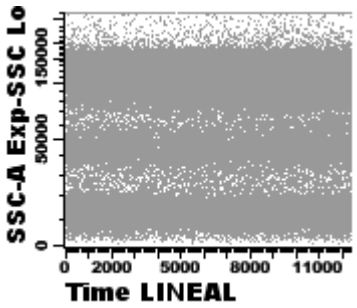


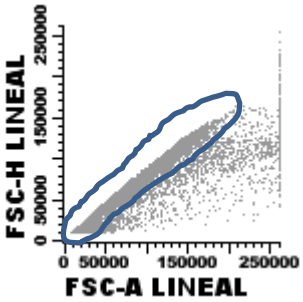


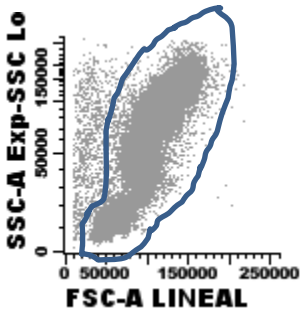


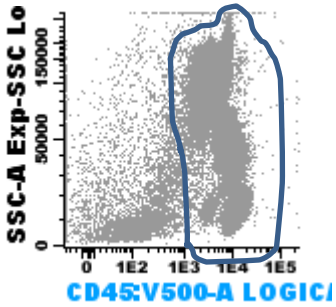
EL ANÁLISIS DE LEUCOCITOS PERMITE EVALUAR EL TAMAÑO DEL CLON HPN

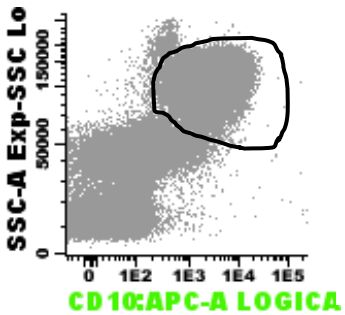
ANÁLISIS DE NEUTROFILOS

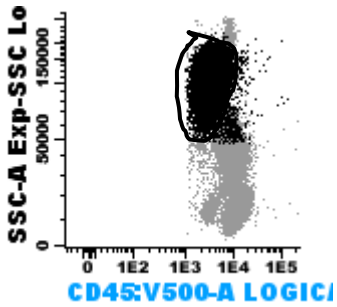


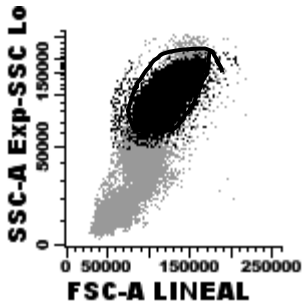


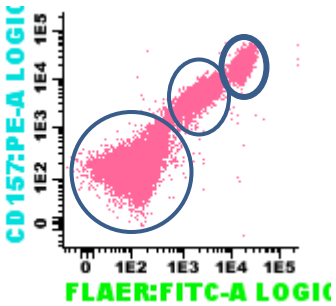


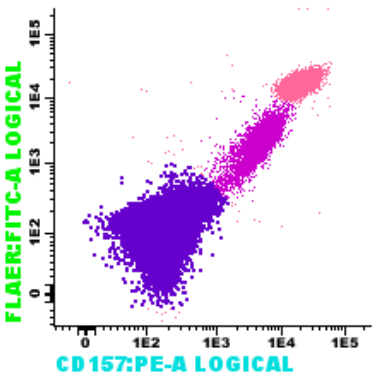


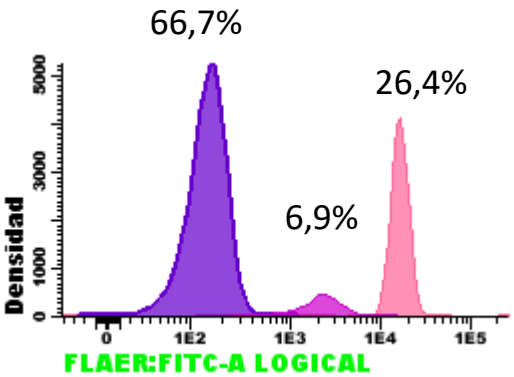


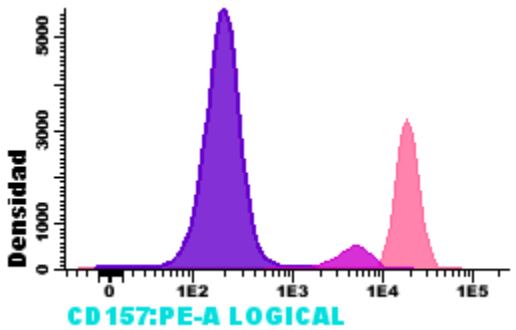






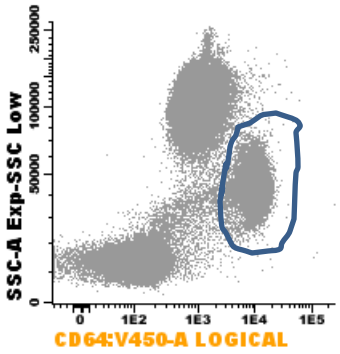


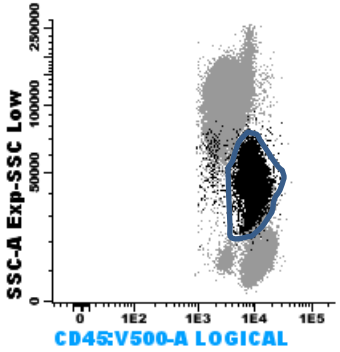


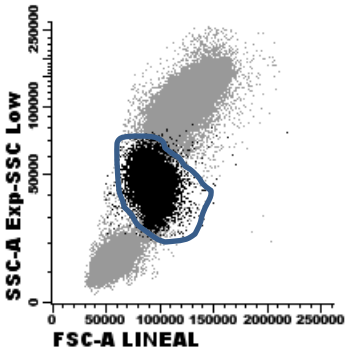


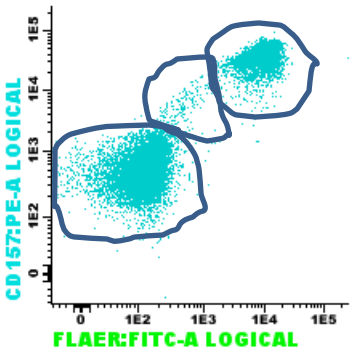
Tamaño Total Clon HPN: 73,6%

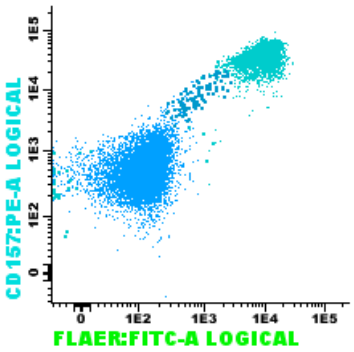
ANÁLISIS DE MONOCITOS

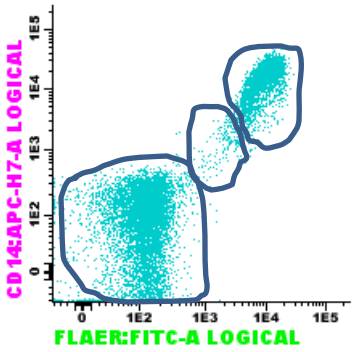


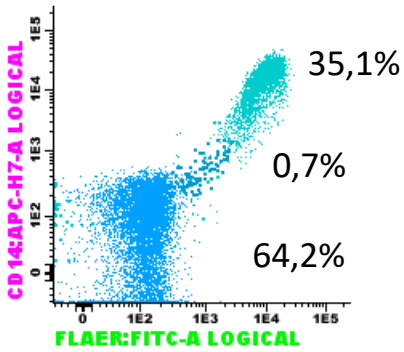


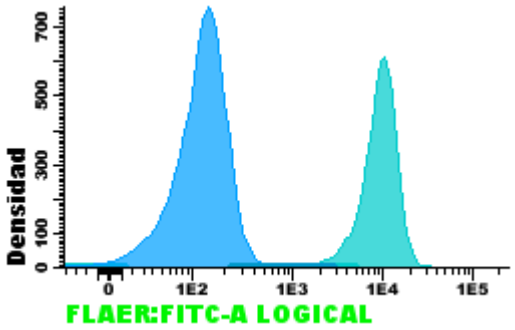


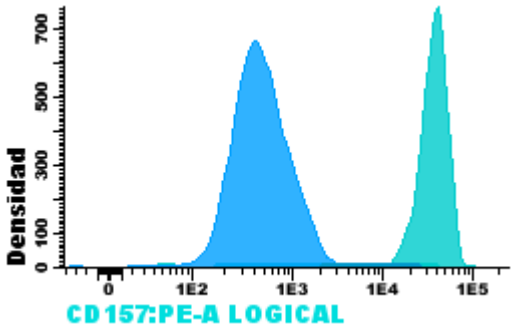


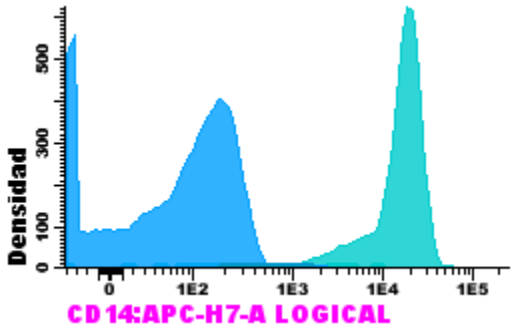












Tamaño Total Clon HPN: 64,9%

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Para el diagnóstico de HPN se requiere la demostración de la deficiencia de al menos 2 proteínas ancladas a GPI en al menos 2 poblaciones celulares diferentes, con el fin de excluir los casos que presentan deficiencias congénitas de un solo antígeno y obviar algunos problemas técnicos.

Para la identificación de clones HPN pequeños en pacientes con desórdenes de falla medular (Aplasia y MDS) es necesario realizar ensayos de alta sensibilidad.

Programme Result - UK NEQAS

ukneqas.org.uk/programmes/result/?programme=paroxysmal-nocturnal-haemoglobinuria

Aplicaciones | ¡Bienvenido a Faceb... | Yahoo | SOCIEDADES CIENT... | REVISTAS | VARIOS | Traductor de Google | WhatsApp | Área del Cliente - N... | Rimuu | Freelance Il...

RESULTS ENTRY | HELP ME | LOGIN

Search Programmes | Search UK NEQAS

UK NEQAS
International Quality Expertise

PROGRAMMES | CENTRES | NEWS | RESOURCES | JOBS | ABOUT | EVENTS | CONTACT US

HOME | FIND A PROGRAMME | PROGRAMME RESULT

BACK TO PREVIOUS PAGE

Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria | HAEMATOLOGY

☆ REGISTER INTEREST

SUMMARY

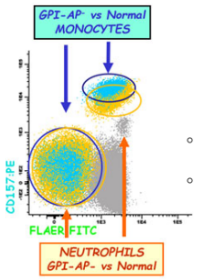
Escribe aquí para buscar

ESP LAA 07:31 p.m. 03/08/2020

Aplicaciones | ¡Bienvenido a Faceb... | Yahoo | SOCIEDADES CIENT... | REVISTAS | VARIOS | Traductor de Google | WhatsApp | Área del Cliente - N... | Rimuu | Freelance Il...

HOME | SIC | CONGRESOS | CURSOS | SOCIO | ENLACES | FAQ | CONTACTO | ZONA SOCIOS

Programa Multicentrico de Control de Calidad: Detección y diagnóstico de HPN por CMF



El programa multicéntrico para la detección y diagnóstico de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna por Citometría de Flujo **comenzó en 2010**. En la actualidad con la participan **30 laboratorios clínicos**.

Los participantes reciben, cada año **16 ficheros de muestras de SP y/o MO de pacientes de HPN y donantes sanos**.

El programa evalúa para cada laboratorio:

- **Identificación y cuantificación de células GPI-deficientes en los compartimentos necesarios para el rastreo y monitorización de pacientes con HPN.**
- **Interpretación de los resultados y diagnóstico sugerido a partir de la información obtenida.**

La evaluación de cada participante se realiza **respecto al total de los laboratorios clínicos**, y **respecto al centro de referencia**. Al tratarse de una técnica reciente, un objetivo del programa es la **implantación y estandarización de estos análisis**.

El programa de Detección y Diagnóstico de HPN por CMF se realiza en colaboración con Alexion.

ALEXION

La inscripción en el programa es de **300 euros** al año.

Hoja de inscripción

Escribe aquí para buscar

ESP LAA 07:28 p.m. 03/08/2020

INFORME

DEBEMOS SER CLARA – EVITAR FRASES CONFUSAS

- AcMo utilizados para diagnóstico y para elección de población.
- Sensibilidad del ensayo (LOQ: límite de cuantificación).
- Tamaño total del clon en cada población.
- Porcentaje de células tipo II y tipo III.
- Comparación con estudios previos si es posible.
- Conclusiones: presencia o ausencia de clon HPN:
  - Población HPN > 1%: clon HPN
  - Población HPN 0.1%- 1%: población menor de células HPN o pequeño clon HPN.
  - Población HPN < 0.1%: raras células con deficiencia GPI o con fenotipo HPN.
- Histogramas o dot plot (Opcional)

RESULTS: PNH CLONE IDENTIFIED IN WBC AND RBC

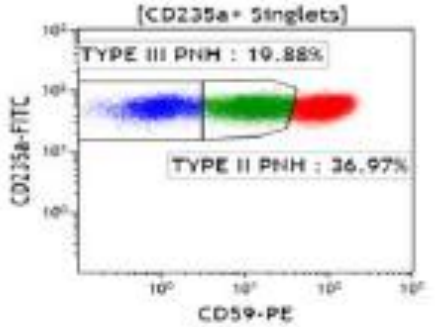
Comment: Flow cytometric analysis shows a PNH clone within the neutrophils (79.5%), monocytes (88.6%) and RBC (56.9%). These findings are consistent with a diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). Any potential difference in clone size between the white blood cells and the red blood cells may be due to hemolysis and/or recent transfusion.

Reference: 1. Borowitz et al: Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of PNH and Related Disorders, Clin Cytometry 2010, 211-230
2. Sutherland et al: Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of PNH clones by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2012; 82:195-208.
3. http://www.pnhsource.com/physicians

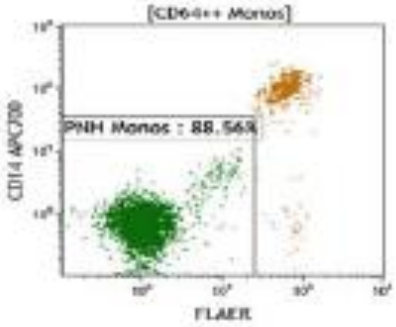
Flow Results: ***Immunophenotypic analysis*** was performed using gating antibodies CD45, CD15, CD64, CD235a, GPI-linked antibodies CD59, CD14, CD24, as well as fluorescent Aerolysin (FLAER).

Cell Type	Deficiency	Result	LLOQ
RBC	Type II (partial CD59 deficiency)	37.0%	NA
	Type III (complete CD59 deficiency)	19.9%	NA
	Total RBC PNH Clone size (Type II and Type III)	56.9%	0.01%
WBC- Monocytes	FLAER/CD14 Deficiency	88.6%	0.1% *
WBC- Neutrophils	FLAER/CD24 Deficiency	79.5%	0.01% *

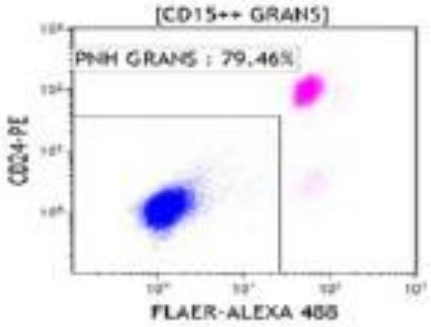
The Lower Limit of Quantitation (LLOQ)* of WBC assay may be decreased in severely pan-cytopenic patients.



Type III and Type II PNH RBC clones



PNH clone (green) in Neutrophils



PNH clone (blue) in Neutrophils

The markers used for this flow cytometric analysis are labeled as Analyte Specific Reagents (ASR) and are used for clinical purposes. The performance characteristics of these markers have been determined by DCDS-Flow Cytometry Laboratory. Their use has not been approved by the U.S. Food and Drug Administration; the FDA has determined that such approval is not necessary.

RESULTS: 1. RARE CELLS WITH PNH PHENOTYPE DETECTED IN RBC
2. RARE CELLS WITH PNH PHENOTYPE IDENTIFIED IN WBC

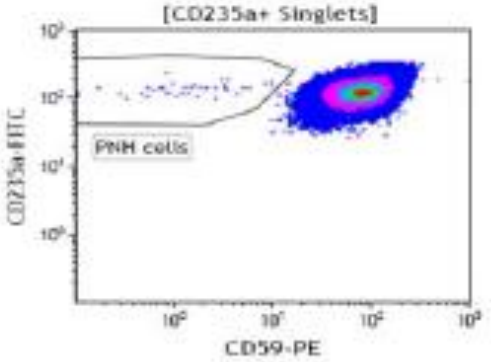
Comment: Flow cytometric analysis shows rare cells with PNH phenotype in the RBC and neutrophils. The clinical significance of these minute populations with GPI deficiency is uncertain at this time; however, an evolving PNH clone cannot be entirely excluded. Consider repeat testing in 6-12 months. Clinical correlation with other laboratory data and follow-up is recommended.

Reference: 1. Borowitz et al: Guidelines for the Diagnosis and Monitoring of PNH and Related Disorders, Clin Cytometry 2010, 211-230
2. Sutherland et al: Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of PNH clones by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2012; 82:195-208.
3. http://www.pnhsource.com/physicians

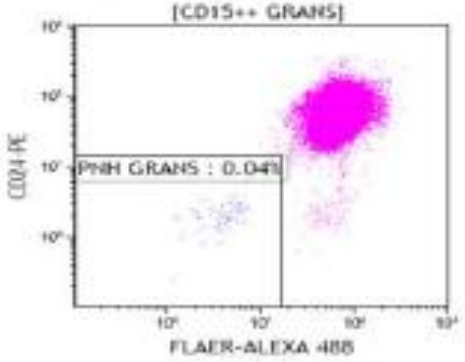
Flow Results: ***Immunophenotypic analysis*** was performed using gating antibodies CD45, CD15, CD64, CD235a, GPI-linked antibodies CD59, CD14, CD24 and FLAER.

Cell population	Result	LLOQ
CD235a+ RBC	Rare cells with PNH phenotype detected (below LLOQ)	0.01%
CD64+ Monocytes	No FLAER/CD14-negative cells detected	0.1% *
CD15+ Neutrophils	0.04% PNH cells identified	0.01% *

The Lower Limit of Quantitation (LLOQ)* of WBC assay may be decreased in severely pan-cytopenic patients.



38 PNH cells/991,710 total RBC



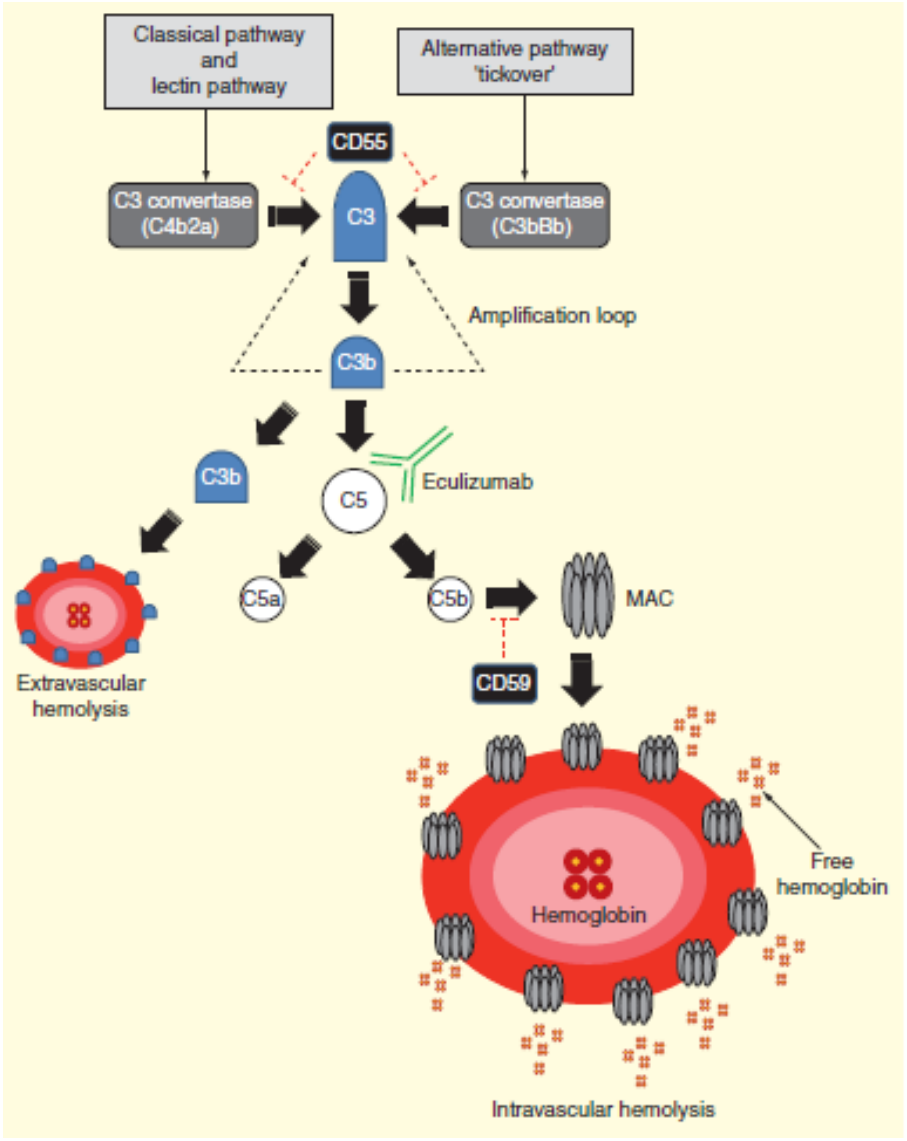
68 PNH cells/177,638 total Neutrophils

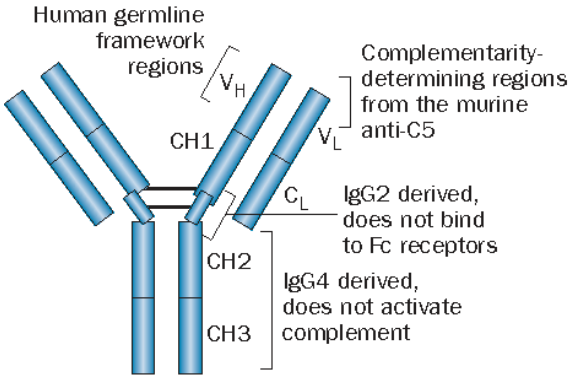
The markers used for this flow cytometric analysis are labeled as Analyte Specific Reagents (ASR) and are used for clinical purposes. The performance characteristics of these markers have been determined by DCDS-Flow Cytometry Laboratory. Their use has not been approved by the U.S. Food and Drug Administration; the FDA has determined that such approval is not necessary.

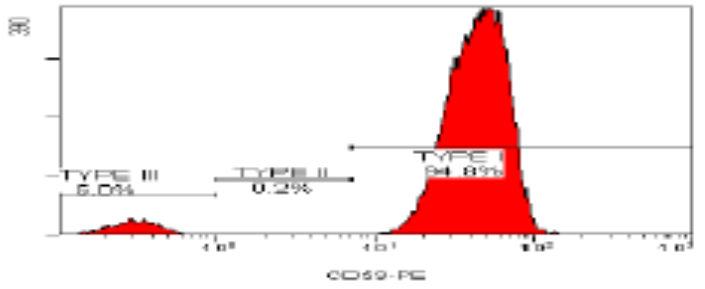
MONITOREO DEL CLON HPN

- Realizar monitoreo del tamaño del clon HPN en forma regular (cada 6 a 12 meses o ante cualquier cambio en la clínica del paciente).
- Los cambios en el tamaño del clon HPN (aumento o disminución) pueden reflejar cambios en la clínica del paciente.
- En pacientes con HPN subclínica es importante el control porque pueden progresar a la forma clásica y esto es precedido por el aumento en el tamaño del clon.
- En pacientes en tratamiento con Eculizumab realizar el estudio al inicio del tratamiento, a los 6 meses y luego un monitoreo anual.
- Control luego del TMO para monitoreo del engrafment y control de recaída.

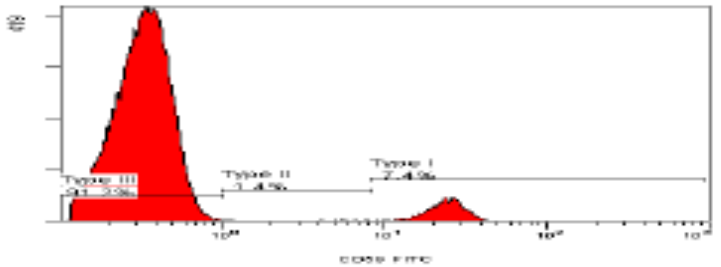
MONITOREO DEL CLON HPN DURANTE TRATAMIENTO CON ECULIZUMAB







A



B

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 78B:211–230 (201

RESÚMEN

- La citometría de flujo es actualmente la técnica de elección para el diagnóstico de HPN.
- La muestra ideal es la sangre periférica.
- El estudio de la expresión de moléculas asociadas a GPI debe realizarse en varias líneas celulares, con al menos dos antígenos celulares. En la práctica el estudio se realiza sobre la población de monocitos, neutrófilos y hematíes.
- El estudio de las proteínas asociadas a GPI debe combinarse con marcadores que nos permitan identificar correctamente las distintas poblaciones celulares de interés.
- El estudio en monocitos y neutrófilos permite identificar clones HPN independientemente del grado de hemólisis o transfusiones recibidas.
- Para identificación de pequeños clones HPN realizar citometría de alta sensibilidad (≥ 4 colores y mayor adquisición de eventos).

MUCHAS GRACIAS

novoaviviana@yahoo.com.ar